Spektrometrično ugotavljanje antioksidativne sposobnosti piperidinskih alkaloidov pri radikalskih reakcijah v celicah govejih jeter

Miha SLAPNIČAR[1], Tia KRALJ[1], Matej VOŠNJAK[2] in Iztok DEVETAK[1]
[1]Pedagoška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Kardeljeva ploščad 16, 1000 Ljubljana
[2]Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana

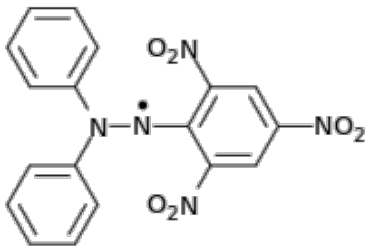
Povzetek: Dandanes se zaradi njihovega zdravilnega učinka pri mnogih škodljivih procesih v telesu, vse bolj poudarja pomembnost uživanja sadja, zelenjave in začimb. Ena izmed pomembnih zdravilnih rastlin je tudi črni poprovec (*Piper nigrum* L.), katerega plodovi imajo veliko vlogo v prehrani. Poper namreč vsebuje veliko antioksidantov, ki že v nizkih koncentracijah upočasnijo ali celo inhibirajo škodljivo delovanje radikalov in oksidacijske procese. Preučevanje snovi z antioksidativno sposobnostjo, ki so prisotne v vsakdanjem življenju, ima pomembno vlogo, saj številne študije dokazujejo, da imajo te snovi pozitiven učinek pri preprečevanju in zdravljenju različnih bolezni. V raziskavi je bila z metodo DPPH določena antioksidativna sposobnost piperina in ostalih piperidinskih alkaloidov v nevtralizacijski reakciji DPPH• radikalov z antioksidantom. Reakcija je bila izvedena brez in ob prisotnosti govejih jeter, ki so bile uporabljene kot primer organa v telesu, zadolženega za razstrupljanje ter potek številnih reakcij pretvorb strupenih spojin. Antioksidativna sposobnost in razbarvanje DPPH raztopine (indikator antioksidativne sposobnost), je bilo potrjeno pri vseh izvlečkih poprov, tako brez in ob dodatku jetrnega macerata, te vrednosti pa so se med seboj razlikovale.

Ključne besede: radikali, antioksidanti, piperidinski alkaloidi, piperin, antioksidativna sposobnost.

Teoretični uvod

Radikali

Celica je osnovna gradbena in funkcionalna enota vseh živih organizmov, v kateri potekajo številne spontane in katalizirane reakcije. Te predstavljajo sintezno pot nastajanja radikalov, ki povzročajo celične poškodbe. V raziskavi je bilo preučevano delovanje DPPH• radikala (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), ki je reagiral z donorjem vodika – antioksidantom. Gre za stabilen radikal (slika 1) z delokaliziranim in nesparjenim elektronom, ki onemogoča dimerizacijo molekul, kot je to pogosto pri ostalih radikalih (Lunec, 1990; Mravljak in Pečar, 2015).



Slika 1: Formula molekule DPPH• radikala (vir: Wikipedija).

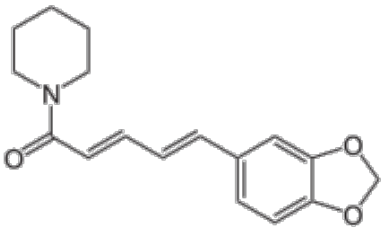
Antioksidanti

Gre za reducente, ki v reakciji z radikalskimi strukturami donirajo vodikov atom ali elektron. Cilj tovrstnih reakcij je pretvorba reaktivnega radikala ali oksidanta v manj reaktiven radikal oziroma nereaktiven produkt. Pri reakciji antioksidanta z radikalom vedno nastane stabilen radikal, ki v splošnem ni več sposoben nadaljevati reakcije oksidacije. Antioksidativni učinek je določen z vrsto antioksidanta, z njegovim mehanizmom delovanja, interakcijami z drugimi antioksidanti, vnosom, odmerkom in presnovo (Mravljak in Pečar, 2015). Dober antioksidant je tisti, ki je ob pravem času na pravem mestu. Pri raziskavi so bili glavni antioksidanti piperin in zmes ostalih piperidinskih alkaloidov, izolirani iz različnih vrst plodov črnega poprovca (*Piper nigrum* L.) (Buettner idr., 1998).

Alkaloidi

Alkaloidi so široka skupina naravnih organskih spojin, ki so zaradi dušikovega atoma v heterociklu alkalni in imajo že v zelo majhnih odmerkih pomembne biološke učinke na žive organizme. Najdemo jih predvsem v rastlinah, najpogosteje v cvetočih. Alkaloidi so se izkazali s svojimi

protivnetnimi in antikancerogenimi lastnostmi, prav tako pa so znani kot analgetiki in lokalni anestetiki. Uporabni so kot prehranski dodatki, nepogrešljivi so v farmaciji in medicini ter v drugih aplikacijah človeškega življenja. Kot matične spojine so alkaloidi pomembni v organski sintezi za iskanje novih sintetičnih spojin z morebiti boljšo biološko aktivnostjo (Meghwal in Goswami, 2013). Opisane značilnosti veljajo tudi za alkaloid piperin (slika 2) in ostale piperidinske alkaloide, ki jih najdemo v vseh vrstah plodov črnega poprovca (Grošelj idr., 2019; Slapničar in Boh Podgornik, 2021).



Slika 2: Formula molekule piperina (vir: Wikipedija).

Črni poprovec (*Piper nigrum* L.)

V raziskovalni nalogi so bili kot rastlinski materiali, iz katerih je bil izoliran piperin in ostali piperidinski alkaloidi, uporabljene različne vrste plodov črnega poprovca. Gre za rastlino ovijalko, s koničastim, podolgovatim in ozkim socvetjem, ki nosi bele cvetove, iz katerih se razvijejo jagode. Uporabljeni so bili črni, beli in zeleni plodovi črnega poprovca. Črni poper so cele nedozorele poprove jagode, katere poberejo, ko postanejo rumene s pomočjo tresenja in teptanja. Beli poper pridobijo po obiranju zrelih jagod rdečih plodov, katere v nekaj korakih še obdelajo. Zeleni poper pa pridobivajo iz nedozorelih poprovih jagod, pri čemer posušene zelene plodove mehansko obdelajo (Slapničar idr., 2021).

Namen in raziskovalna vprašanja

Namen raziskave je bil spektrometrično ugotoviti, kakšno antioksidativno sposobnost imajo piperidinski alkaloidi iz treh različnih vrst plodov črnega poprovca *(črni, beli in zeleni)* pri nevtralizaciji DPPH• radikalov brez prisotnosti celic in v maceratu celic govejih jeter.

V raziskavi sta bili zastavljeni dve raziskovalni vprašanji:

1) Izvleček katere vrste plodov črnega poprovca (*Piper nigrum L.*) ima največjo antioksidativno sposobnost? in

2) Kakšno antioksidativno sposobnost imajo izolirani piperidinski alkaloidi plodov črnega poprovca (*Piper nigrum* L.) pri aplikaciji na macerat jetrnih celic?

Doprinos prispevka k znanosti je prikaz analize stanja antioksidativne sposobnost različnih vrst plodov črnega poprovca na standardnem vzorcu in ob aplikaciji na jetrne celice, ki jih najdemo v človeškem telesu.

Metoda raziskovanja

Vzorec

Vzorec za analizo so predstavljali izolati piperina in ostalih piperidinskih alkaloidov treh vrst plodov črnega poprovca (črni, beli in zeleni), standard piperina in celični macerat govejih jeter (vloga substrata). Izvlečki poprov so bili kristalinične oblike (zelene, bež in temno zelene barve), standard piperina pa je bil v obliki prahu bele barve.

Opis instrumenta

Spektrometrične meritve absorbance raztopine DPPH ob dodatku izvlečkov poprov brez oziroma s substratom, so bile izvedene s pomočjo spektrometra (Go direct Spectrovis plus).

Potek raziskave

Raziskovanje je potekalo na osnovi različnih eksperimentalnih metod. Uporabljene so bile metode izolacije piperidinskih alkaloidov iz črnega, zelenega in belega popra, metoda DPPH in spektrometrična metoda.

Podatki so bili statistično analizirani s programom Spectral Analysis. Izvedeni sta bili deskriptivna in inferenčna statistična obdelava, s katerima je bilo mogoče odgovoriti na zastavljeni raziskovalni vprašanji.

Rezultati z diskusijo

Rezultati raziskave spektrometričnega določanja absorbance raztopine DPPH ob dodatku izvlečkov poprov brez substrata kažejo, da ima pri radikalski reakciji največjo antioksidativno sposobnost izvleček belega popra, kjer pride do znižanja absorbance za 52,6 %. Sledi izvleček črnega popra z 49,5 % znižanjem, nato raztopina standardnega piperina z 43,3 % znižanjem in nazadnje še izvleček zelenega popra, kjer pride do znižanja za 29,1 %. Ugotovljeno je bilo, da imajo

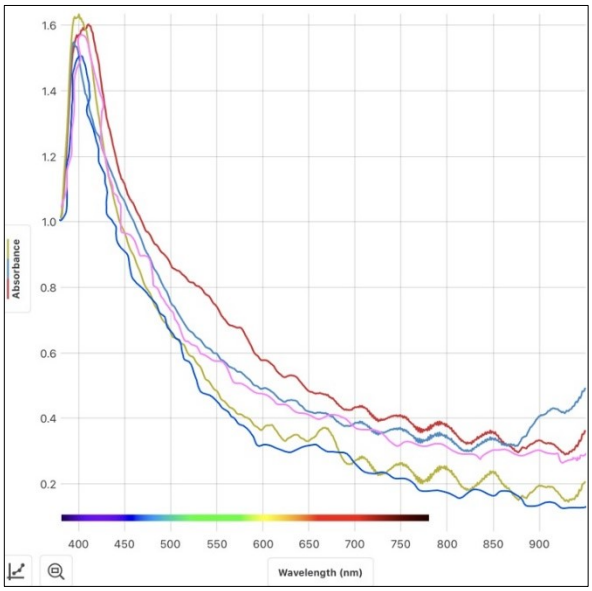
pri radikalskih reakcijah različne vrste popra različno antioksidativno sposobnost, največjo ima beli poper, sledita črni poper in standard piperina, najmanjšo antioksidativno sposobnost pa ima zeleni poper. Enak postopek je bil izveden še ob prisotnosti substrata. Rezultati kažejo, da ima pri radikalskih reakcijah v celicah govejih jeter največjo antioksidativno sposobnost-največji delež razbarvanja DPPH raztopine izvleček belega popra z znižanjem absorbance za 34,2 %. Sledi izvleček črnega popra z znižanjem za 16,8 %, izvleček zelenega popra z 12,2 %, medtem ko je imela raztopina standardnega piperina najmanjšo antioksidativno sposobnost z znižanjem absorbance za 7,7 %. Povzeti je mogoče, da imajo pri radikalskih reakcijah v celicah govejih jeter izvlečki plodov črnega poprovca večjo antioksidativno sposobnost, kot standard piperina, kar je najverjetneje posledica prisotnosti tudi drugih snovi (t.i. sekundarnih metabolitov). Ugotovljeno je bilo, da imajo plodovi različno antioksidativno sposobnost, kar je lahko povezano z različno zrelostjo in obdelavo plodov, ki vpliva na vsebnost sekundarnih metabolitov in ostalih antioksidantov.
Podatki o izmerjenih absorbancah so zapisani v preglednici 1.

Preglednica 1: Meritve absorbance pri raztopini standardnega piperina in izvlečkih različnih vrst plodov črnega poprovca brez oziroma s substratom jetrnega macerata.

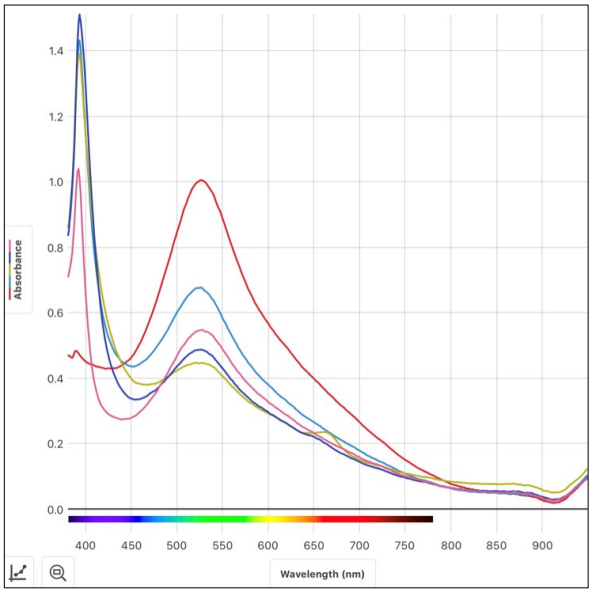
Vrsta p.	jetrni m.	A1	A2	A3	A4	A5	AOP1	AOP2	AOP3	AOP4	AOP5
Črni p.	da	0,607	0,611	0,604	0,608	0,62	18,41	17,4	12,5	18,5	17
Beli p.	da	0,483	0,487	0,481	0,478	0,48	35,08	34,2	30,3	35,9	35,36
Zeleni p.	da	0,64	0,646	0,641	0,643	0,64	13,98	12,7	7,1	13,8	13,09
Standard	da	0,678	0,675	0,672	0,679	0,68	8,87	8,78	2,61	8,98	8,77
DPPH	da	0,744	0,74	0,69	0,746	0,74	0	0	0	0	0
A- Absorbanca											
Vrsta p.	jetrni m.	A1	A2	A3	A4	A5	AOP1	AOP2	AOP3	AOP4	AOP5
Črni p.	ne	0,479	0,483	0,473	0,474	0,48	51,12	49,3	48,4	48,8	49,63
Beli p.	ne	0,444	0,456	0,452	0,448	0,44	54,69	52,2	50,7	51,6	53,53
Zeleni p.	ne	0,665	0,672	0,679	0,667	0,67	32,14	29,5	26	28	29,61
Standard	ne	0,533	0,531	0,544	0,538	0,54	45,61	44,3	40,7	41,9	43,62
DPPH	ne	0,98	0,953	0,917	0,926	0,95	0	0	0	0	0
A- Absorbanca											

Graf 1 in graf 2 prikazujeta meritve absorbanc v odvisnosti od valovnih dolžin brez jetrnega macerata (graf 1) in meritev ob aplikaciji na raztopino jetrnega macerata (graf 2).

Statistični model (graf 3) ocenjuje, da se je antioksidativni potencial statistično značilno različno spreminjal med različnimi vrstami uporabljenih poprov glede na prisotnost oziroma odsotnost jetrnega macerata. Prav tako je bila statistično značilna interakcija med glavnima faktorjema. Razvidno je, da je bil % inhibicije največji pri belem popru ob odsotnosti jetrnega macerata. Ob odsotnosti jetrnega macerata se % inhibicije izvlečka belega popra ni razlikoval od izvlečka črnega, je pa imela raztopina standardnega piperina manjši % inhibicije kot izvleček belega popra.

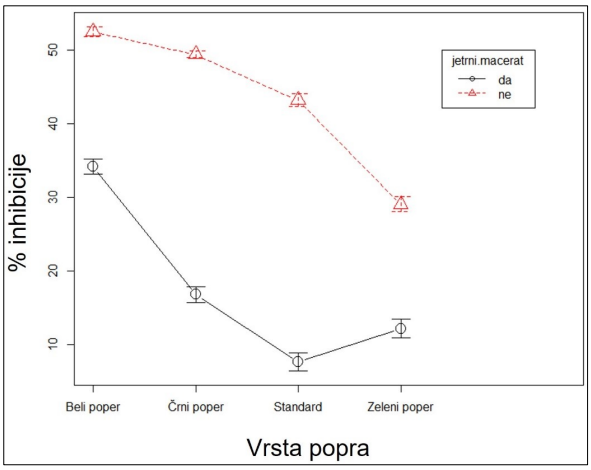


Graf 1: Prikaz meritev absorbanc v odvisnosti od valovnih dolžin brez jetrnega macerata.



Graf 2: Prikaz meritev absorbanc v odvisnosti od valovnih dolžin ob aplikaciji na raztopino jetrnega macerata.

Izvleček zelenega popra je imel od vseh oblik ob odsotnosti jetrnega macerata najmanjši % inhibicije. Ob prisotnosti jetrnega macerata je imel izvleček belega popra največji % inhibicije, sledil mu je izvleček črnega popra. Izvleček zelenega popra in raztopina standardnega piperina sta imela najmanjši % inhibicije – med njima ni bilo statistične razlike.



Graf 3: Diagram povprečij s pripadajočimi standardnimi napakami (*n*=5) za % inhibicije glede na vrsto izvlečka popra in uporabo jetrnega macerata.

Zaključki

V raziskavi je bilo ugotovljeno, da imajo popri antioksidativno sposobnost kar kažejo tudi rezultati drugih raziskav. Najvišja izmerjena antioksidativna sposobnost je bila zaznana pri izvlečku belega popra, kateremu je sledil izvleček črnega popra. Antioksidativna sposobnost raztopine standardnega piperina in izvlečka zelenega popra je bila obrnjena pri poskusu z jetrnim maceratom in brez njega – v primeru prisotnosti jetrnega macerata je imela boljšo antioksidativno sposobnost raztopina standardnega piperina, v poskusu brez jetrnega macerata pa izvleček zelenega popra. Zaključiti je mogoče, da imajo izvlečki različnih vrst plodov črnega poprovca dobre antioksidativne sposobnosti.

Jetra so organ, ki človeško telo razstruplja preko številnih radikalskih reakcij. Pozitivno ujemanje rezultatov meritev absorbance ob dodatku jetrnega macerata in brez njega potrjuje antioksidativen učinek piperina in ostalih piperidinskih alkaloidov na živalske celice pri radikalskih reakcijah. Dokazano je, da celicam ob vnosu različnih vrst popra v telo pomagamo pri hitrejši nevtralizaciji tovrstnih reakcij in pretvorbi strupenih in škodljivih snovi. Izpostaviti velja vidik zelene kemije in kemije naravnih spojin, saj za inhibicijo DPPH• radikalov niso bile uporabljene sintetične in strupene snovi, temveč naravni izvlečki različnih vrst plodov črnega poprovca.

Viri in literatura

- Banji, D., Bindu Madhavi, B., Naga Madhu, M., Ramalingam, R., Ravinder Nath, A. in Swetha, D. (2009). Extraction, identification, formulation and evaluation of piperine in alginate beads. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, str. 156-161.
- Buettner, G. R., Flanager, S. W. in Moseley, P. L. (1998). Increased flux of free radicals in cells subjected to hyperthermia: detection by electron paramagnetic resonance spin trapping. *FEBS Letters*, str. 285-286.
- Grošelj, U., Kranjc, K. in Požgan, F. (2019). Biološko pomembne spojine. *Univerzitetni učbenik.* Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.
- Lunec, J. (1990). Free radicals: their involvement in disease processes. *SAGE Journals,* str. 173-182.
- Meghwal, M. in Goswami, T. K. (2013). Piper nigrum and piperine: An update. *Phytotherapy Research*. str 1121-1130.
- Mravljak, J. in Pečar, S. (2015). Šumi življenja ali radikali in druge reaktivne snovi v telesu. *Učbenik*. Slovensko farmacevtsko društvo, Fakulteta za farmacijo.
- Slapničar, M. in Boh Podgornik, B. (2021). Naravne spojine v živih sistemih. *Univerzitetni učbenik.* Univerza v Ljubljani, Pedagoška fakulteta.
- Slapničar, M., Grintal, H., Čuk, A. L. in Vošnjak, M. (2021). Antimikotične lastnosti piperidinskih alkaloidov iz plodov črnega poprovca (*Piper nigrum* L.). *Proteus, 83*(9/10), str. 464-469.